

Departement für Nutztiere, Klinik für Fortpflanzungsmedizin  
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor a.i.: Prof. Dr. U. Braun  
und  
Swissgenetics Zollikofen  
Direktor: Dr. S. Felder

**Einfluss der Verdünnungsgeschwindigkeit  
und Aequilibrationszeit auf die Qualität von Gefriersamen  
beim Stier**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

**Rebecca Rickenbacher**

Tierärztin  
von Läufelfingen/BL

genehmigt auf Antrag von

PD Dr. F. Janett, Referent  
PD Dr. G. Hirsbrunner, Korreferentin

Zürich 2009



# Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	SUMMARY	3
3	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	5
4	TIERE, MATERIAL UND METHODEN	7
4.1	Tiere	7
4.2	Samengewinnung	7
4.3	Untersuchung des Ejakulates	7
4.4	Samenverdünnung	8
4.5	Samenkonfektionierung und Aequilibrationszeit	9
4.6	Kryokonservierung	9
4.7	Bestimmung der Samenqualität	10
4.7.1	Motilität	10
4.7.2	Membran- und Akrosomintegrität	11
4.7.3	DNA-Integrität	13
4.8	Statistische Auswertung	14

5	ERGEBNISSE	15
5.1	Einfluss der Verdünnerzugabe auf die Samenqualität	15
5.1.1	Totale Motilität	15
5.1.2	Progressive Motilität	16
5.1.3	Gesteigerte Motilität	17
5.1.4	Spermiengeschwindigkeit	18
5.1.5	Vitale und akrosomintakte Spermien	19
5.1.6	Vitale und akrosomreagierte Spermien	20
5.1.7	DNA-Integrität	21
5.2	Einfluss der Aequilibrationszeit auf die Samenqualität	22
5.2.1	Samenqualität vor dem Einfrieren	22
5.2.2	Samenqualität nach dem Auftauen	26
6	DISKUSSION	35
7	LITERATUR	39
8	DANK	43

# **DER WISSENDE WEISS, DASS ER GLAUBEN MUSS**

FRIEDRICH DÜRRENMATT



# 1 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, die Auswirkungen der Geschwindigkeit der Verdünnerzugabe (Versuch 1) und einer unterschiedlich langen Aequilibrationszeit (Versuch 2) auf die Gefriersamenqualität beim Stier abzuklären. Dazu wurden jeweils 6 Ejakulate von 10 zufällig ausgewählten Stieren gewonnen, mit TRIS-Eigelb Verdünner verarbeitet, in 0.25 ml Pailletten abgepackt, auf 4°C abgekühlt und in einem automatischen Einfriergerät tiefgefroren. Für Versuch 1 wurden die Ejakulate im Verhältnis 1:2 vorverdünnt, während 5 Min. bei 32°C inkubiert und anschliessend in drei gleiche Teile aufgeteilt. Die Endverdünnung erfolgte schrittweise, kontinuierlich oder schnell. In Versuch 2 wurde die Zugabe des Verdünners schrittweise vorgenommen und der Samen vor dem Tiefgefrieren während 1.5, 3, 4.5, 6 und 24 Std. aequilibriert. Die Beurteilung der Samenqualität erfolgte vor und während der Aequilibration sowie nach dem Auftauen. Die Ergebnisse zeigen, dass die unterschiedlich gewählte Geschwindigkeit der Verdünnerzugabe keinen signifikanten Einfluss auf die Samenqualität hatte. Hingegen führte eine zunehmende Aequilibrationsdauer zu einer signifikant besseren Samenqualität im aufgetauten Samen. Unsere Untersuchungen mit TRIS-Eigelb Verdünner lassen den Schluss zu, dass die Geschwindigkeit der Verdünnerzugabe die Qualität des Gefriersamens nicht beeinflusst. Die Aequilibrationszeit hingegen hat einen deutlichen Effekt auf die Samenqualität, wobei beste Ergebnisse bei 6 oder 24 Std. erreicht werden.





## 2 Summary

The aim of the present study was to investigate the influence of semen dilution speed (experiment 1) and different aequilibration times (experiment 2) on quality of frozen-thawed bovine semen. For this study 6 ejaculates each, from 10 dairy bulls were collected at the AI-center of Swissgenetics. Semen was diluted with TRIS-egg yolk extender, packaged in 0.25 ml straws, cooled to 4°C and frozen in an automatic freezer. In experiment 1 ejaculates were pre-diluted 1:2, incubated for 5 min at 32°C and then split into three equal parts. Semen dilution to the final concentration was continued using three different methods, stepwise, continuously or rapid. In experiment 2, semen was diluted stepwise and equilibrated for 1.5, 3, 4.5, 6 and 24 h. Semen quality was analyzed before and during aequilibration as well as after cryopreservation. The results demonstrate that the dilution speed had no significant effect on the semen quality. Regarding equilibration time, a significant effect on all measured semen quality parameters could be shown in frozen-thawed semen. From our study using TRIS-egg yolk extender it is concluded that deviation in dilution speed has no influence on the quality of frozen-thawed semen. Equilibration time, however, has a significant effect on semen quality with best results obtained after 6 or 24 hours.



### 3 Einleitung und Fragestellung

Die künstliche Besamung (KB) bei Nutztieren in der Schweiz ist ein wichtiges Verfahren in der heutigen Rinderzucht. Zurzeit werden in der Schweiz 90% der Rinder- und Kuhpopulation mit tiefgefrorenem Samen belegt. Entscheidend für den Besamungserfolg sind unter anderem die Brunsterkennung, beziehungsweise die Bestimmung des optimalen Besamungszeitpunktes, die Samenqualität sowie die korrekte Samenübertragung auf das weibliche Tier. Zu den wichtigsten Vorteilen der KB gehören die lange Lagerfähigkeit der Samendosen, der flexible Einsatz unabhängig von Ort und Zeit sowie eine optimale Kontrolle der Gesundheitsüberwachung im Bereich des Reproduktionsgeschehens. Die jährlich von Swisshgenetics ermittelte durchschnittliche Non-Return-Rate (NRR) 75 Tage nach KB mit Gefriersperma lag 2008 bei rund 66% und ist im Vergleich zu Studien mit Frischsamen (NRR49 = 71%, Vishwanath und Shannon, 2000) deutlich tiefer. Aus zahlreichen Untersuchungen (Holt, 2000; Salomon et al., 2000; Vishwanath und Shannon, 2000; Watson, 2000) ist schon lange bekannt, dass Spermien durch den Prozess der Kryokonservierung in ihrer Befruchtungsfähigkeit im Vergleich zu Frischsamen in unterschiedlichem Masse geschädigt werden. Für eine erfolgreiche Befruchtung der weiblichen Eizelle im Eileiter müssen die Spermien einen intakten Mitochondrienapparat zur Energiegewinnung bei der Wanderung durch den weiblichen Genitaltrakt sowie eine vollumfänglich funktionelle Plasmamembran (Kapazitation und Zona-Bindung) und ein intaktes Akrosom (Zona-Penetration) aufweisen. Als schädigende Einflussfaktoren gelten in erster Linie die grossen Temperaturschwankungen, die unterschiedlichen osmotischen Verhältnisse nach der Verdünnungszugabe und die damit verbundene Zelldehydratation sowie die intra- und extrazellulären Kristallisationsvorgänge (Bailey et al., 2000; Bilodeau et al., 2001; Holt et al., 2000; Lessard et al., 2000; Salomon und Maxwell, 2000; Watson, 2000). Die als Folge der Kryokonservierung entstandenen Membranschädigungen führen unweigerlich zu einer verminderten Vitalität und Befruchtungsfähigkeit der Samenzelle. Während des Auftauens kommen zudem die gleichen Faktoren nochmals zur Wirkung.

Aufgrund dieser Aspekte ist es ausserordentlich wichtig, die einzelnen Schritte von der Ejakulatgewinnung über das Einfrieren und Auftauen bis zur Übertragung des Samens auf das weibliche Tier optimal zu gestalten (DeJarnette, 1999). Da

Samenzellen nicht nur auf Temperaturunterschiede (Kälteschock) sondern auch auf Milieuveränderungen während der Verdünnung des Ejakulates (Lösungseffekt) sehr empfindlich reagieren, kommen der Geschwindigkeit der Verdünnerzugabe sowie der Abkühlgeschwindigkeit und Aequilibrationszeit vor dem Tiefgefrieren eine bedeutende Rolle zu.

Leider sind diese Schritte im Verarbeitungsprozess von Stiersamen nur ungenügend untersucht und finden in der Literatur kaum Erwähnung. Deshalb bestand das Ziel der vorliegenden Studie darin, die Auswirkungen a) einer unterschiedlich schnellen Verdünnerzugabe und b) einer unterschiedlich langen Aequilibrationsdauer auf die Qualität von kryokonserviertem Stiersamen zu untersuchen.

## **4 Tiere, Material und Methoden**

### **4.1 Tiere**

Für die vorliegende Studie wurden insgesamt 10 zufällig ausgewählte Stiere im Alter von 1 bis 3 Jahren verwendet. Die Rasseverteilung beschränkte sich auf die Milchrassen Schweizer Fleckvieh, Brown Swiss, Red Holstein und Holstein. Die tägliche Futterration pro Stier setzte sich aus Heu, Grassilage, 1.5-2 kg Maiswürfel, 1-1.5 kg Kraftfutter sowie Mineralstoff- und Vitaminsubstituierung zusammen. Die ausgewählten Stiere wurden in Anbindehaltung auf Stroh gehalten.

### **4.2 Samengewinnung**

Zur Samengewinnung wurden die Stiere regelmässig zweimal in der Woche mittels künstlicher Scheide (Scheideninnentemperatur 40-42°C) abgesamt. Vor der Samengewinnung wurden die Stiere in der Sprunghalle mit sogenannten Leersprüngen sexuell stimuliert, wobei der Aufsprung nach individuellen Vorlieben am Phantom oder auf einen männlichen Artgenossen als Deckpartner erfolgte. Für jeden Stier stand eine sterile künstliche Scheide zur Verfügung. Unmittelbar nach der Gewinnung des Ejakulates wurde der Sprung elektronisch mittels Ohrmarkenscanner erfasst, das Samenauffangröhrchen etikettiert und sofort zur Weiterverarbeitung in die Laborschleuse verbracht. Von jedem Stier wurden 6 Ejakulate an jeweils 6 unterschiedlichen Sprungtagen für die Untersuchungen gewonnen.

### **4.3 Untersuchung des Ejakulates**

Die Qualität des frisch gewonnenen Ejakulates wurde grobsinnlich auf Farbe, Menge und Fremdpartikel untersucht sowie Dichte und Motilität bestimmt. Zur Volumenbestimmung wurde das Ejakulat gewogen und mit dem Faktor 1.05 für das spezifische Gewicht von Stiersamen multipliziert. Die Spermiedichtebestimmung erfolgte mit Hilfe eines Spektrophotometers (PCP 6121, Eppendorf-Nehteler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland). Die Beurteilung der Motilität, insbesondere der Vorwärtsbeweglichkeit, erfolgte subjektiv mittels Phasenkontrastmikroskop (Axiolab, Carl Zeiss AG, Feldbach, Schweiz) bei 100- und 200-facher Vergrösserung auf

einem vorgewärmten Objektträger. Ebenso wurde die Spermienmorphologie subjektiv bestimmt.

Sämtliche Ejakulate mussten vor der Weiterverarbeitung die Qualitätsanforderungen für Frischsamen erfüllen: Motilität >75%, Dichte > 300'000 Spermien/ $\mu$ l, Mindestvolumen  $\geq$ 1.00 ml, keine von Auge sichtbaren Beimengungen und nur geringe morphologische Abweichungen (Punktesystem). Alle Daten des Ejakulates wurden über das Computerprogramm SMILE (IMV, Aîgle, Frankreich) erfasst und gespeichert.

## **4.4 Samenverdünnung**

### **Versuch I**

Zur Untersuchung über die Auswirkungen der Geschwindigkeit der Verdünnerzugabe wurden im Versuch I insgesamt drei unterschiedliche Methoden miteinander verglichen:

#### **a) Standardmethode (V0)**

Das frisch gewonnene Ejakulat wurde im Wasserbad bei 32°C im one-step-Verfahren mit Triladyl® (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland)-Eigelb im Verhältnis 1:2 vorverdünnt und während 5 Min. stehen gelassen. Anschliessend wurde das Ejakulat in eine im Wasserbad vorgewärmte Babyflasche gegeben und bis zur gewünschten Endkonzentration von 80 Millionen Samenzellen/ml (Standardkonzentration von 15 Millionen Spermien pro Paillette mit 210 $\mu$ l Nutzvolumen) in durchschnittlich 2-3 Verdünnungsschritten von 1:7 im ersten, 1:17 im zweiten und falls nötig 1:20 im dritten, mit Verdünner versehen. Die Inkubationszeit zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten betrug durchschnittlich 3 Min. (Thun et al., 2002).

#### **b) Fraktionierte Zugabe (V1)**

Die Verdünnung des vorverdünnten Samens auf die Endkonzentration von 80 Millionen Samenzellen/ml erfolgte jede Minute in konstanten kleinen Verdünnungsschritten von 1:7 während einer Dauer von 10 Minuten.

### **c) Schnellzugabe (V2)**

Die Verdünnung des vorverdünnten Samens auf die Endkonzentration von 80 Millionen Samenzellen/ml erfolgte schnell in wenigen Sekunden in einem einmaligen Verdünnungsschritt.

## **4.5 Samenkonfektionierung und Aequilibrationszeit**

Nach Herstellung der Endkonzentration erfolgte die automatische Konfektionierung in 0.25 ml Pailletten und die anschliessende Verteilung der Pailletten auf Racks bei Raumtemperatur zwischen 18°C und 22°C. Anschliessend wurden die Pailletten während 30 Min. im Kühlraum auf 4°C abgekühlt und der Samen bei dieser Temperatur weiter bis zum Tiefgefrieren aequilibriert. Im Versuch I wurde eine Aequilibrationszeit von 4.5 Std. (Standardmethode) angewendet.

### **Versuch II**

Zur Untersuchung über die Auswirkungen der Aequilibrationsdauer wurden im Versuch II insgesamt fünf unterschiedliche Aequilibrationszeiten der standardmässig konfektionierten Ejakulatsproben miteinander verglichen:

- Methode A, 1.5 Std. Aequilibrationszeit
- Methode B, 3 Std. Aequilibrationszeit
- Methode C, 4.5 Std. Aequilibrationszeit
- Methode D, 6 Std. Aequilibrationszeit
- Methode E, 24 Std. Aequilibrationszeit

## **4.6 Kryokonservierung**

Anschliessend an die Aequilibrationszeit erfolgte die computergesteuerte Samengefrierung (Digitcool 5300 3T, IMV, Aîgle, Frankreich) von +4°C bis -110°C mit einer Abkühlgeschwindigkeit von 40°C/Min. und von -110°C bis -140°C mit einer Abkühlgeschwindigkeit von 30°C/Min. Unmittelbar nach der Tiefgefrierung wurden die Pailletten in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

## 4.7 Bestimmung der Samenqualität

### 4.7.1 Motilität

Die objektive Bestimmung der Motilität erfolgte mittels computerassistierter Spermienanalyse (CASA, Hamilton Thorne IVOS, Version 14, Beverly, MA, USA). Um Fehlzählungen von Eigelbpartikeln des Verdünners durch das System zu vermeiden, wurden die Spermien mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff auf der Basis von Hoechst 33342 (IDENT<sup>TM</sup>, Hamilton Thorne, Beverly, MA, USA) angefärbt (Tardif et al., 1998). Dazu wurde eine Färbelösung mit 1 ml Kulturmedium (Embryo Transfer Holding Medium, IMV, Aîgle, Frankreich) und 40 µg IDENT hergestellt. 50 µl der Färbelösung wurden zu 50 µl Samen gegeben und während 15 Min. bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurden je 5 µl der gefärbten Samenprobe in eine standardisierte Kammer von 20 Micrometer Tiefe (standard count analysis chambers, Art. no. SC 20-01-C, Leja, Nieuw-Vennep, Niederlande) gegeben und mindestens 10 Felder mit dem CASA beurteilt. Die Messungen erfolgten mit den Analyseinstellungen für Stiersamen und IDENT-Färbung gemäss Herstellerangaben des Gerätes (Tab. 1).

Für die Auswertung wurden der Prozentsatz an total und progressiv motilen, sowie schnellen Spermien (rapid cells, velocity average path VAP > 50 µm/s) und die Geschwindigkeit (velocity straight line VSL) berücksichtigt. Die Motilitätsbestimmung mittels CASA wurde im endverdünnten Ejakulat, nach der Konfektionierung, am Ende der Aequilibrationszeit sowie 10 und 120 Min. nach dem Auftauen (25 Sek. bei 37°C) des tiefgefrorenen Samen durchgeführt.



**Tabelle 1:** Analyse-Einstellungen für mit IDENT™ angefärbten Stiersamen.

Parameter	Einstellung
Frames per second	60
Number of frames	30
Minimum contrast	20
Minimum cize	5pix
Default cell size	5pix
Default cell intensity	70
VAP	50
STR	70
Slow Cells	static
VAP Cut Off	30
VSL Cut Off	15
Min. intensity gate	0.30
Max. intensity gate	1.70
Min. size gate	0.10
Max. size gate	3.40
Min. elongation gate	8
Max. elongation gate	97
Standard objective	10x UV
Target photometer	45-55
Field type	dark
Chamber depth	20
Temperature	37

#### 4.7.2 Membran- und Akrosomintegrität

Die Bestimmung der Membran- und Akrosomintegrität wurde mit Hilfe einer SYTO®60/PI/PNA-FITC Färbung vorgenommen. Der Farbstoff SYTO®60 färbt die DNA aller Spermien und emittiert nach Laseranregung Licht im Wellenbereich um 755 nm. Der PI-Farbstoff durchdringt beschädigte Zellmembranen und bindet an die

DNA toter Spermien, so dass diese nach Anregung im Wellenbereich um 620 nm fluoreszieren. PNA-FITC besteht aus Arachis hypogaea Lektin (PNA), das selektiv an die äussere Akrosommembran bindet und einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC) der nach Laseranregung im Wellenbereich um 525 nm emittiert. Bei akrosomintakten vitalen Spermien ist die Plasmamembran nur für SYTO®60, nicht aber für FITC-PNA oder PI permeabel. Spermien mit intakter Plasmamembran und intaktem Akrosom färben sich somit nur mit SYTO®60 und fluoreszieren bei 755 nm. Kommt es bei vitalen Spermien im Rahmen der Akrosomreaktion zur Vesikulation, kann sich PNA an die äussere Akrosommembran binden, so dass diese Spermien ein FITC-positives Signal (525 nm) zeigen. Spermien mit geschädigter Plasmamembran, die aber noch Teile der äusseren Akrosommembran besitzen, zeigen ein positives PI (620 nm) und FITC Signal (620nm). Spermien deren Plasmamembran geschädigt und deren Akrosom völlig degeneriert, verloren oder auch vollkommen intakt ist, lassen sich nur mit PI anfärben (Garner et al., 1999; Cheng et al., 1996).

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Pailletten während 1 Min. bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und der Inhalt auf eine Mikrotiterplatte gegeben. Zur Herstellung der Färbelösung wurden 10 ml TALP-HEPES-Pufferlösung mit 1 µl SYTO®60 (5 mM, S11342, Invitrogen, Basel), 10 µl Propidium Iodid (P3566, 1 mg/ml, Invitrogen, Basel) und 2 µl PNA-FITC (VEC-FL-1071, 10 mg/ml, Biozol, Eching, Deutschland) gemischt. Danach wurden 10 µl der Samenprobe mit einer 8-Kanal-Pipette zu 200 µl Färbelösung auf eine zweite Mikrotiterplatte gegeben, gemischt und während 15 Min. bei Raumtemperatur und im dunkeln inkubiert.

Die Analyse der Proben erfolgte in einem Durchflusszytometer (Cytomics FC 500, Beckman Coulter Inc., Fullerton Kanada, USA). Das Gerät ist mit einem Argonionen- (488nm) sowie einem Helium-Neon-Laser (633 nm) ausgestattet und kann fünf verschiedene Fluoreszenzen messen (525 nm, 575 nm, 620 nm, 675 nm, 755 nm). In jeder Probe wurden 5'000 Spermien analysiert. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software FlowJo7.2.2 (TreeStar Inc., Ashland, Oregon, USA). Die Spermien wurden hinsichtlich ihrer Plasmamembranintegrität und der Unversehrtheit des Akrosoms in vier verschiedene Populationen eingeteilt (Krienke, 2003), wobei die Zuordnung mit Hilfe des Analyseprogramms FlowJo7.2.2 folgendermassen erfolgte:

- Spermien mit intakter Plasmamembran und intaktem Akrosom (PI und FITC neg.)
- Spermien mit intakter Plasmamembran und defektem Akrosom (PI neg. und FITC pos.)
- Spermien mit defekter Plasmamembran und intaktem Akrosom (PI pos. und FITC neg.)
- Spermien mit defekter Plasmamembran und degeneriertem Akrosom (PI und FITC neg.)

In unserer Studie wurde die oben beschriebene Färbung im vorverdünnten Samen, nach der Konfektionierung und nach der Aequilibrationszeit, sowie im aufgetauten Samen durchgeführt.

#### **4.7.3 DNA-Integrität**

Die Beurteilung der DNA-Integrität der Spermien wurde mittels flowzytometrischer Spermienchromatinstrukturanalyse (SCSA™) durchgeführt (Evenson et al., 1991; 1994; 1995). Dieses Analyseverfahren beruht auf dem Prinzip, dass abnormal strukturiertes Chromatin in situ eine höhere Empfindlichkeit für eine physikalisch oder chemisch induzierte Denaturierung besitzt als normal verdichtetes Chromatin. Eine Denaturierung der DNA durch Säure führt zur teilweisen Auftrennung der normalerweise doppelsträngig vorliegenden DNA in Einzelstränge. Bei der anschliessenden Färbung mit Akridinorange kommt es zu einer Anlagerung des Farbstoffs an die DNA. Doppelsträngige DNA emittiert Licht im Wellenbereich um 525 nm (grün), einzelsträngige DNA hingegen zeigt eine Fluoreszenz im Wellenbereich um 675 nm (rot). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wird die Intensität der verschiedenen Fluoreszenzen gemessen und für jedes Spermium der Anteil der roter Fluoreszenz an der gesamten Fluoreszenz (rot und grün) bestimmt und mit einer Zahl zwischen 0 und 1 angegeben. Dieser Wert wird als DNA Fragmentation Index (DFI-Wert) bezeichnet (Evenson et al., 2002). Die DFI-Werte der einzelnen Spermien werden in einem Histogramm dargestellt und in eine Spermienpopulation mit niedrigen und höheren DFI-Werten aufgeteilt. Aus dem Histogramm lässt sich der prozentuale Anteil an Spermien mit erhöhtem DFI-Wert (DFI %) ableiten.

Für die Durchführung des SCSA™ wurden 10 µl der Samenprobe mit 200 µl eines Säuredetergens (Aqua dest, NaCl, Triton-X100, HCl N2, pH = 1.2) während 30 Sek. auf einem Vortex-Schüttler gemischt. Anschliessend wurden 600 µl Akridinorange (10 mg/ml, A-8097, Sigma) hinzugefügt und während 3 Min. inkubiert. Für jede Probe wurden 5'000 Spermien im Durchflusszytometer (Cytomics FC 500, Beckman Coulter Inc., Fullerton Kanada, USA) mit Filtern von 525 nm (grüne Fluoreszenz) sowie 675 nm (rote Fluoreszenz) mit einer Durchflussrate von 200-300 Zellen pro Sek. analysiert. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software FlowJo7.2.2 (TreeStar Inc., Ashland, Oregon, USA).

In unserer Studie wurde die DNA-Integrität im vorverdünnten Ejakulat sowie im aufgetauten Samen bestimmt.

#### **4.8 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm StatView 5.0 (SAS Institut, Dübendorf, Schweiz). In Versuch I wurde der Einfluss des Stieres, der Verdünnerzugabe und des Zeitpunktes der Untersuchung auf die Samenqualitätsparameter mit einer multivariaten Varianzanalyse (ANOVA) geprüft. Zur Berechnung von Unterschieden zwischen den einzelnen Methoden der Verdünnerzugabe wurden die Ergebnisse dem Bonferroni/Dunn post-hoc Test unterzogen. Im Versuch II wurde der Einfluss des Stieres und der Aequilibrationszeit mittels ANOVA auf die Samenqualitätsparameter überprüft. Ein Vergleich der Werte bei verschiedenen Aequilibrationszeiten erfolgte mit dem Bonferroni/Dunn post-hoc Test. Die Signifikanzschwelle wurde bei  $P < 0.05$  festgelegt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Einfluss der Verdünnerzugabe auf die Samenqualität

Die Ergebnisse zur Überprüfung des Einflusses von Stier, Methode der Verdünnerzugabe, Zeitpunkt der Untersuchung und Interaktion von Stier und Methode der Verdünnerzugabe sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Daraus ist ersichtlich, dass der Stier auf alle bestimmten Parameter einen hoch signifikanten Einfluss hatte. Die Methode der Verdünnerzugabe und die Interaktion von Methode und Stier hingegen wiesen keinen signifikanten Einfluss auf die gemessenen Samenqualitätsparameter auf.

**Tabelle 2:** Einfluss von Stier, Methode der Samenverdünnung, Messzeitpunkt sowie Interaktion von Stier und Methode auf die Qualität des aufgetauten Samens.

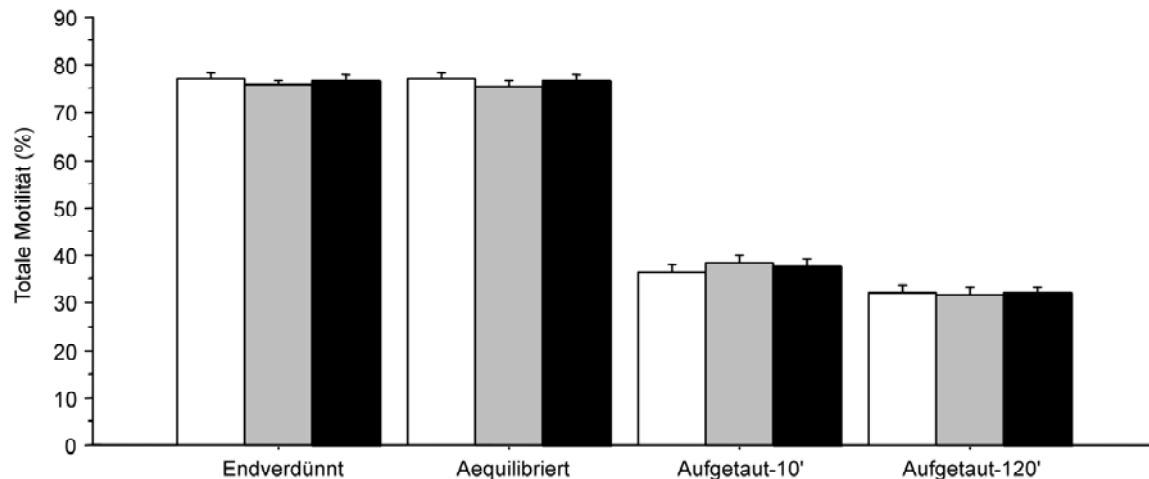
Parameter	Stier <i>P</i>	Methode <i>P</i>	Messzeitpunkt <i>P</i>	Stier/Methode <i>P</i>
Motilität total	.0007*	.9417	<.0001*	.8720
Motilität progressiv	<.0001*	.9501	<.0001*	.9855
Motilität rapid	<.0001*	.9108	<.0001*	.9410
Geschwindigkeit	<.0001*	.6423	<.0001*	>.9999
Vital und akrosomintakt	<.0001*	.9953	<.0001*	>.9999
Vital und akrosomreagiert	<.0001*	.4642	<.0001*	>.9999
DNA-Integrität	<.0001*	.5093	.3547	.9945

\*signifikant ( $P < 0.05$ )

#### 5.1.1 Totale Motilität

Die Durchschnittswerte der totalen Motilität während der Samenverarbeitung sowie 10 und 120 Min. nach dem Auftauen bei 37°C, sind in Abbildung 2 grafisch dargestellt. Nach unterschiedlicher Verdünnerzugabe betrugen die Werte zum Zeitpunkt der Endverdünnung  $77.4 \pm 1.0\%$  für V0,  $76.0 \pm 1.0\%$  für V1 und  $76.9 \pm 1.2\%$  für V2. Die entsprechenden Werte nach Aequilibration von 4.5 Std. betrugen

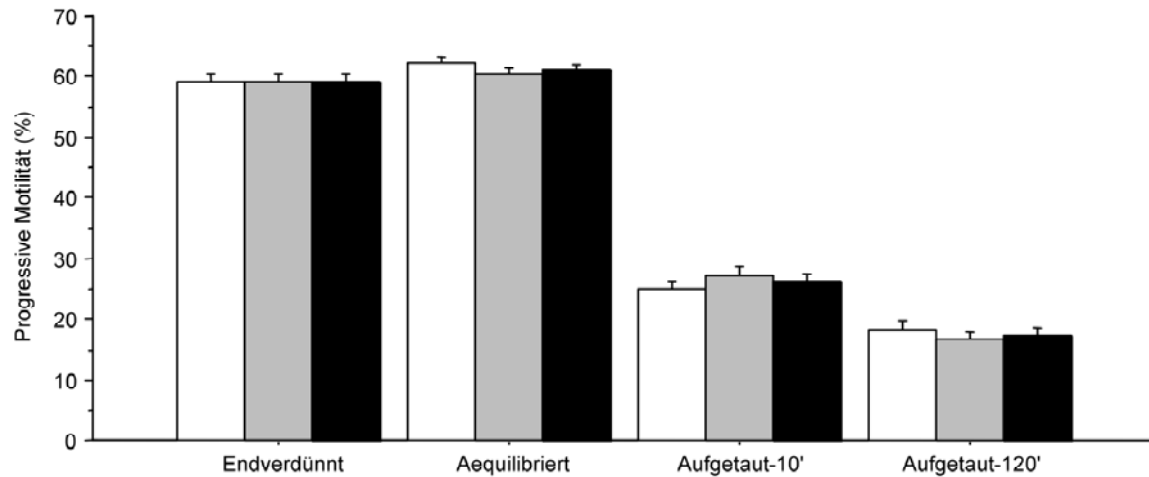
77.5±1.0%, 75.7±1.1% bzw. 76.8±1.1%. Die totale Motilität im aufgetauten Samen betrug nach 10 und 120 Min. 36.3±1.6% und 32.1±1.6% für V0, 38.4± 1.7% und 31.6±1.5% für V1 sowie 37.5±1.6% und 32.0±1.5% für V2. Zwischen den einzelnen Methoden der Verdünnerzugabe waren keine signifikanten Unterschiede vorhanden.



**Abbildung 2:** Durchschnittliche ( $m \pm SEM$ ) totale Motilität von Spermien an verschiedenen Zeitpunkten vor dem Gefrieren und nach dem Auftauen bei verschiedener Verdünnerzugabe. V0 (□), V1 (■) und V2 (■).

### 5.1.2 Progressive Motilität

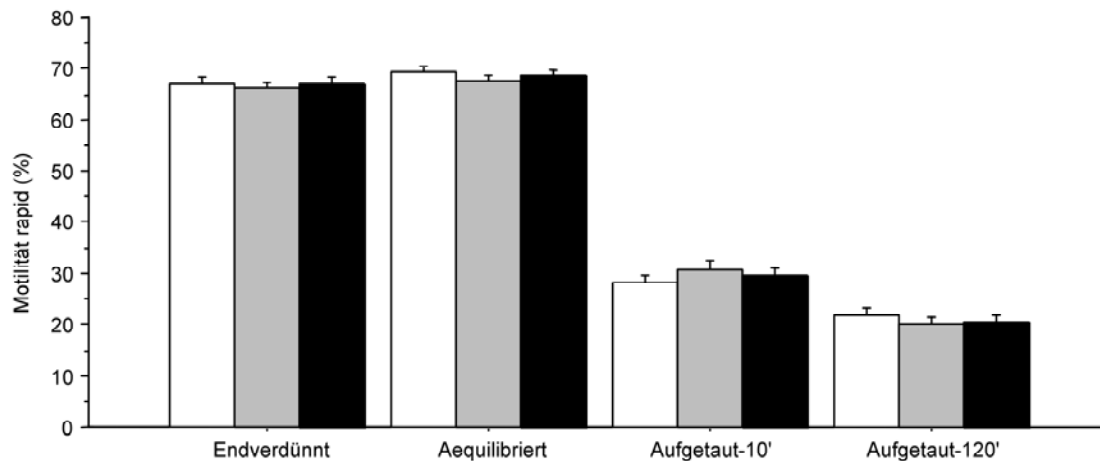
Die Durchschnittswerte der progressiven Motilität während der Samenverarbeitung sowie 10 und 120 Min. nach dem Auftauen bei 37°C sind in Abbildung 3 grafisch dargestellt. Nach unterschiedlicher Verdünnerzugabe betrugen die Mittelwerte zum Zeitpunkt der Endverdünnung 59.3±1.2% für V0, 59.3±1.0% für V1 und 59.3±1.1% für V2. Die entsprechenden Werte nach einer Aequilibrationsdauer von 4.5 Std. betrugen 62.4±0.9%, 60.4±0.9% bzw. 61.0±1.0%. Die progressive Motilität im aufgetauten Samen betrug nach 10 und 120 Min. 25.0±1.2% und 18.2±1.5% für V0, 27.3±1.3% und 16.6±1.4% für V1 sowie 26.2±1.2% und 17.2±1.4% für V2. Zwischen den einzelnen Methoden der Verdünnerzugabe waren keine signifikanten Unterschiede vorhanden.



**Abbildung 3:** Durchschnittliche ( $m \pm \text{SEM}$ ) progressive Motilität von Spermien an verschiedenen Zeitpunkten vor dem Gefrieren und nach dem Auftauen bei verschiedener Verdünnerzugabe. V0 (□), V1 (■) und V2 (■).

### 5.1.3 Gesteigerte Motilität

Die Durchschnittswerte der gesteigerten (rapid) Motilität während der Samenverarbeitung sowie 10 und 120 Min. nach dem Auftauen bei 37°C sind in Abbildung 4 grafisch dargestellt. Nach unterschiedlicher Verdünnerzugabe betrugen die Mittelwerte zum Zeitpunkt der Endverdünnung  $67.1 \pm 1.3\%$  für V0,  $66.2 \pm 1.2\%$  für V1 und  $67.1 \pm 1.4\%$  für V2. Die entsprechenden Werte nach einer Aequilibrationsdauer von 4.5 Std. betrugen  $69.4 \pm 1.1\%$ ,  $67.5 \pm 1.2\%$  bzw.  $68.6 \pm 1.2\%$ . Die gesteigerte Motilität im aufgetauten Samen betrug nach 10 und 120 Min.  $28.3 \pm 1.4\%$  und  $21.8 \pm 1.6\%$  für V0,  $30.8 \pm 1.5\%$  und  $20.0 \pm 1.5\%$  für V1 sowie  $29.7 \pm 1.4\%$  und  $20.4 \pm 1.5\%$  für V2. Zwischen den einzelnen Methoden der Verdünnerzugabe waren keine signifikanten Unterschiede vorhanden.

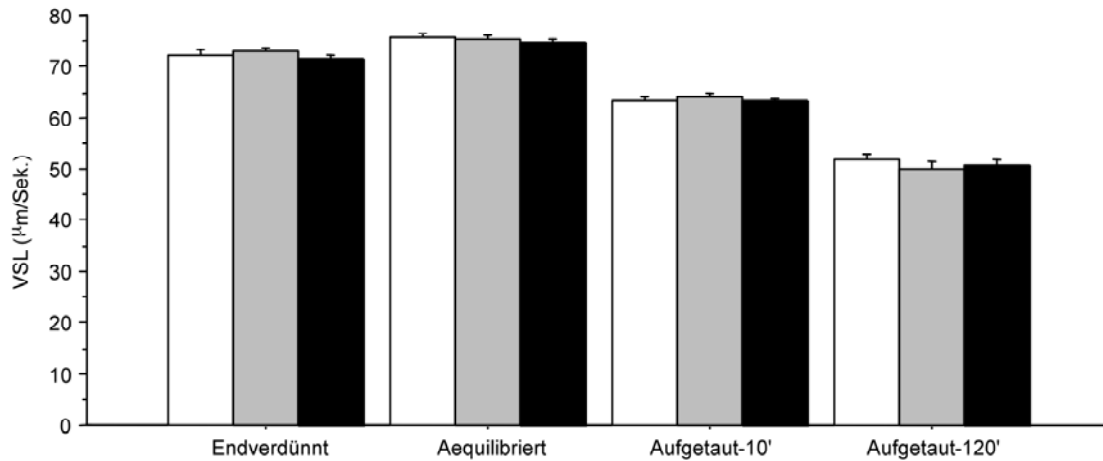


**Abbildung 4:** Durchschnittliche ( $m \pm \text{SEM}$ ) gesteigerte Motilität von Spermien an verschiedenen Zeitpunkten vor dem Gefrieren und nach dem Auftauen bei verschiedener Verdünnerzugabe. V0 ( $\square$ ), V1 ( $\blacksquare$ ) und V2 ( $\blacksquare$ ).

#### 5.1.4 Spermengeschwindigkeit

Die Durchschnittswerte der Spermengeschwindigkeit (VSL) während der Samenverarbeitung sowie 10 und 120 Min. nach dem Auftauen bei 37°C sind in Abbildung 5 grafisch dargestellt. Nach unterschiedlicher Verdünnerzugabe betrugen die Mittelwerte der Spermengeschwindigkeit zum Zeitpunkt der Endverdünnung  $72.2 \pm 1.0 \mu\text{m/s}$  für V0,  $72.8 \pm 0.9 \mu\text{m/s}$  für V1 und  $71.7 \pm 0.7 \mu\text{m/s}$  für V2. Die entsprechenden Werte nach einer Aequilibrationsdauer von 4.5 Std. betrugen  $75.7 \pm 0.7 \mu\text{m/s}$ ,  $75.5 \pm 0.7 \mu\text{m/s}$  bzw.  $74.6 \pm 0.7 \mu\text{m/s}$ . Die Geschwindigkeit im aufgetauten Samen betrug nach 10 und 120 Min.  $63.4 \pm 0.7 \mu\text{m/s}$  und  $51.7 \pm 1.3 \mu\text{m/s}$  für V0,  $64.1 \pm 0.6 \mu\text{m/s}$  und  $50.2 \pm 1.1 \mu\text{m/s}$  für V1 sowie  $63.4 \pm 0.6 \mu\text{m/s}$  und  $50.9 \pm 1.1 \mu\text{m/s}$  für V2. Zwischen den einzelnen Methoden der Verdünnerzugabe waren keine signifikanten Unterschiede vorhanden.

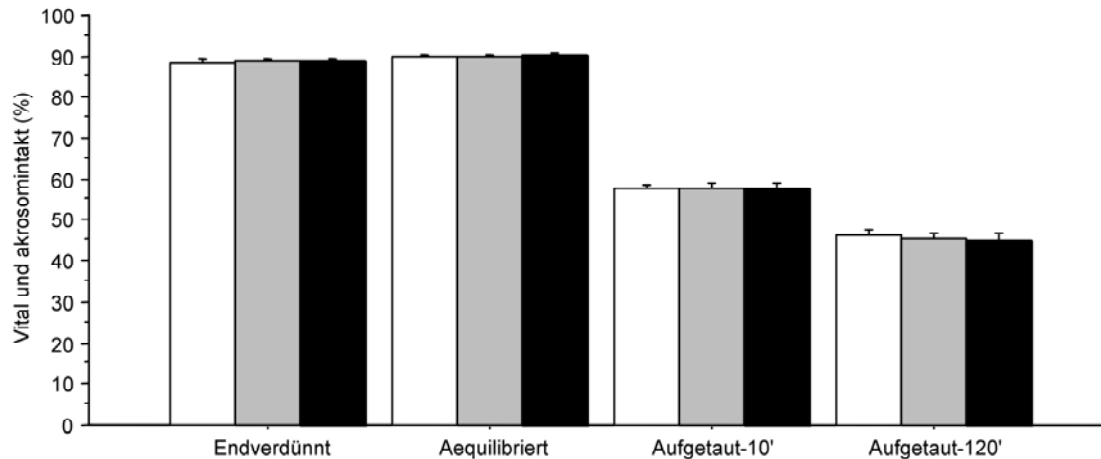




**Abbildung 5:** Durchschnittliche ( $m \pm \text{SEM}$ ) Spermengeschwindigkeit VSL an verschiedenen Zeitpunkten vor dem Gefrieren und nach dem Auftauen bei verschiedener Verdünnerzugabe. V0 (□), V1 (■) und V2 (■).

### 5.1.5 Vitale und akrosomintakte Spermien

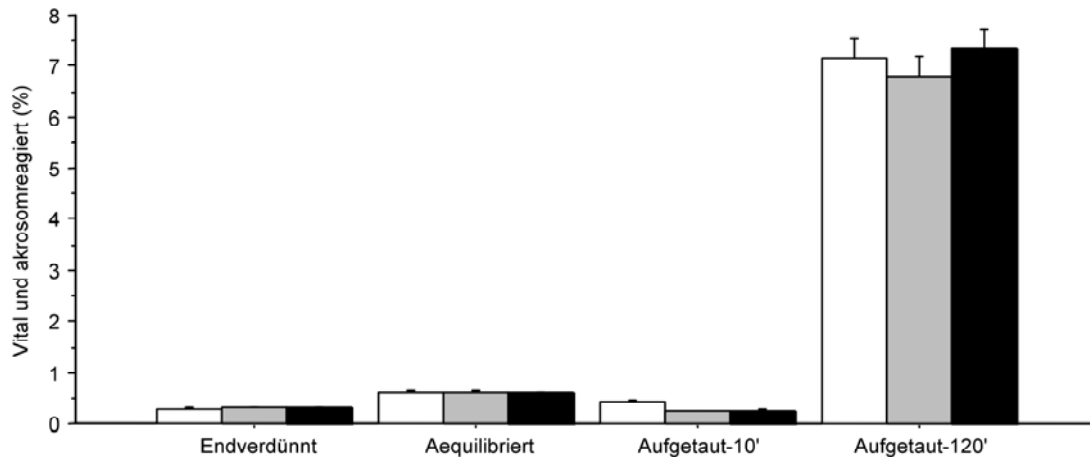
Die Durchschnittswerte von vitalen und akrosomintakten Spermien während der Samenverarbeitung sowie 10 und 120 Min. nach dem Auftauen bei 37°C sind in Abbildung 6 grafisch dargestellt. Nach unterschiedlicher Verdünnerzugabe betrugen die Mittelwerte zum Zeitpunkt der Endverdünnung  $88.7 \pm 0.6\%$  für V0,  $89.2 \pm 0.4\%$  für V1 und  $88.9 \pm 0.5\%$  für V2. Die entsprechenden Werte nach einer Aequilibrationsdauer von 4.5 Std. betrugen  $89.9 \pm 0.4\%$ ,  $89.8 \pm 0.4\%$  bzw.  $90.3 \pm 0.5\%$ . Im aufgetauten Samen betrug die Durchschnittswerte nach 10 und 120 Min.  $57.6 \pm 1.1\%$  und  $46.0 \pm 1.5\%$  für V0,  $57.9 \pm 1.0\%$  und  $45.3 \pm 1.3\%$  für V1 sowie  $57.7 \pm 1.1\%$  und  $45.0 \pm 1.5\%$  für V2. Zwischen den einzelnen Methoden der Verdünnerzugabe waren keine signifikanten Unterschiede vorhanden.



**Abbildung 6:** Durchschnittswerte ( $m \pm \text{SEM}$ ) vitaler und akrosomintakter Spermien an verschiedenen Zeitpunkten vor dem Gefrieren und nach dem Auftauen bei verschiedener Verdünnerzugabe. V0 ( $\square$ ), V1 ( $\blacksquare$ ) und V2 ( $\blacksquare$ ).

### 5.1.6 Vitale und akrosomreagierte Spermien

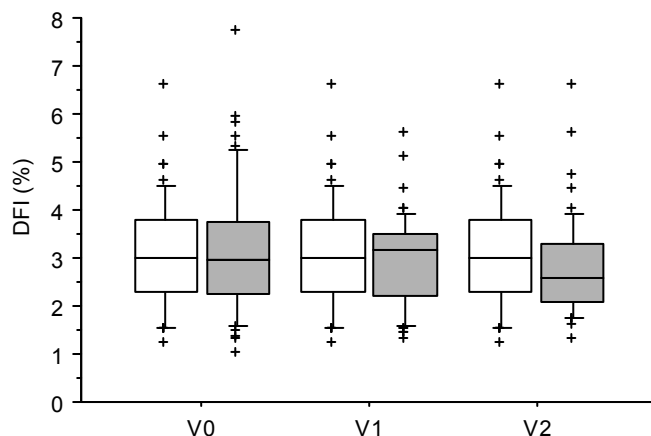
Die Durchschnittswerte von vitalen und akrosomreagierten Spermien während der Samenverarbeitung sowie 10 und 120 Min. nach dem Auftauen bei 37°C sind in Abbildung 7 grafisch dargestellt. Nach unterschiedlicher Verdünnerzugabe betrugen die Mittelwerte zum Zeitpunkt der Endverdünnung  $0.3 \pm 0.1\%$  für V0 sowie  $0.3 \pm 0.2\%$  für V1 und V2. Die entsprechenden Werte nach Aequilibration von 4.5 Std. betrug  $0.6 \pm 0.2\%$  für sämtliche getesteten Methoden. Im aufgetauten Samen betrugen die Durchschnittswerte nach 10 und 120 Min.  $0.4 \pm 0.3\%$  und  $7.2 \pm 2.6\%$  für V0,  $0.2 \pm 0.2\%$  und  $6.8 \pm 2.7\%$  für V1 sowie  $0.2 \pm 0.2\%$  und  $7.4 \pm 2.6\%$  für V2. Zwischen den einzelnen Methoden der Verdünnerzugabe waren keine signifikanten Unterschiede vorhanden.



**Abbildung 7:** Durchschnittswerte ( $m \pm \text{SEM}$ ) vitaler und akrosomreagierter Spermien an verschiedenen Zeitpunkten vor dem Gefrieren und nach dem Auftauen bei verschiedener Verdünnerzugabe. V0 ( $\square$ ), V1 ( $\blacksquare$ ) und V2 ( $\blacksquare$ ).

### 5.1.7 DNA-Integrität

Die Medianwerte der DNA-Fragmentationsindexe im vorverdünnten Samen sowie 10 Min. nach dem Auftauen sind in Abbildung 8 als Boxplot grafisch dargestellt. Nach unterschiedlicher Verdünnerzugabe betrugen die Medianwerte im vorverdünnten Samen 3.0% für V0, V1 und V2 und 10 Min. nach dem Auftauen betrugen sie 3.0% für V0, 3.2% für V1 bzw. 2.6% für V2. Zwischen den einzelnen Methoden der Verdünnerzugabe waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar.



**Abbildung 8:** Boxplot der DNA-Fragmentationsindexe (DFI %) im vorverdünnten ( $\square$ ) und aufgetauten Samen ( $\blacksquare$ ) bei verschiedener Verdünnerzugabe (V0, V1, V2).

## 5.2 Einfluss der Aequilibrationszeit auf die Samenqualität

### 5.2.1 Samenqualität vor dem Einfrieren

Die Ergebnisse zur Überprüfung des Einflusses von Stier, Aequilibrationszeit und der Interaktion von Stier und Aequilibrationszeit auf die Samenqualität vor dem Einfrieren sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Daraus ist ersichtlich, dass der Stier einen signifikanten Einfluss auf alle Parameter ausser dem Prozentsatz an vitalen und akrosomreagierten Spermien hatte. Die Dauer der Aequilibrationszeit wies lediglich auf die gesteigerte Motilität sowie auf die Spermengeschwindigkeit einen signifikanten Einfluss auf und die Interaktion von Stier und Aequilibrationszeit hatte keinen signifikanten Einfluss auf die untersuchten Parameter.

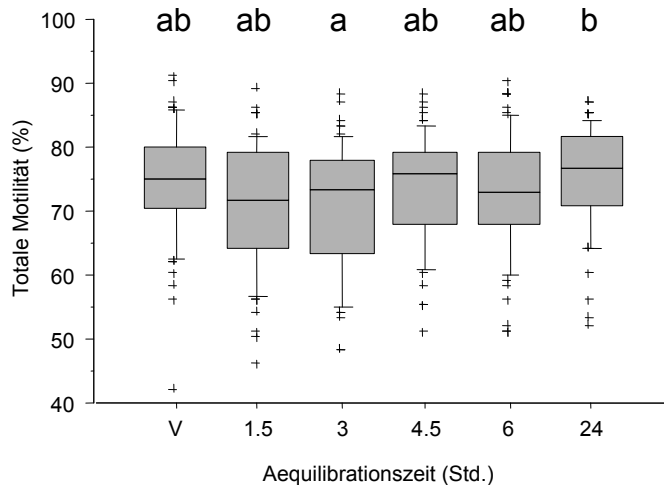
**Tabelle 3:** Einfluss vom Stier, Aequilibrationszeit und Interaktion von Stier und Aequilibrationszeit auf die Samenqualität vor dem Einfrieren.

Parameter	Stier <i>P</i>	Aequilibrationszeit <i>P</i>	Stier/Aequilibrationszeit <i>P</i>
Motilität total	<.0001*	.0373	.6110
Motilität progressiv	.0008*	.0926	.7112
Motilität rapid	.0001*	.0044*	.5517
Geschwindigkeit	<.0001*	.0002*	.4995
Vital und akrosomintakt	<.0001*	.8643	.8469
Vital und akrosomreagiert	.4221	.3126	.4836

\*signifikant ( $P < 0.05$ )

### Totale Motilität

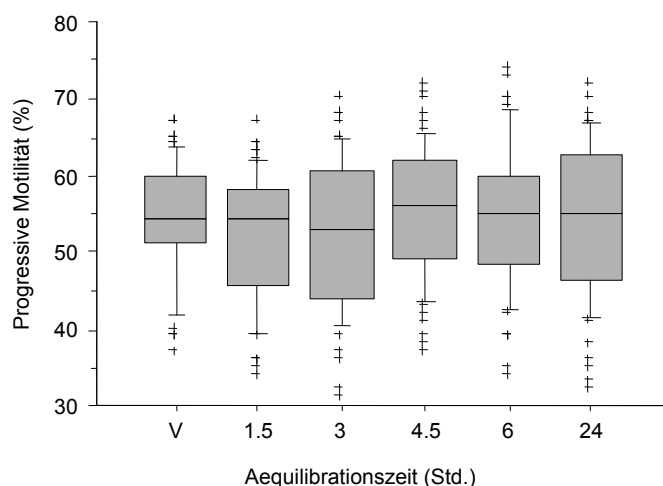
Die Medianwerte der totalen Motilität nach unterschiedlichen Aequilibrationszeit sind in Form von Boxplots in Abbildung 9 grafisch dargestellt. Die Medianwerte der totalen Motilität schwankten je nach Aequilibrationszeit zwischen 72.0% und 77.0%. Zwischen den nach 3 und 24 Std. gemessenen Werten war ein signifikanter Unterschied feststellbar.



**Abbildung 9:** Boxplot der totalen Motilität nach unterschiedlichen Aequilibrationszeiten: V (Endverdünnung), 1.5 Std., 3 Std., 4.5 Std., 6 Std. und 24 Std. Boxplots mit unterschiedlichen Indices<sup>ab</sup> sind signifikant ( $P < 0.05$ ) verschieden.

### Progressive Motilität

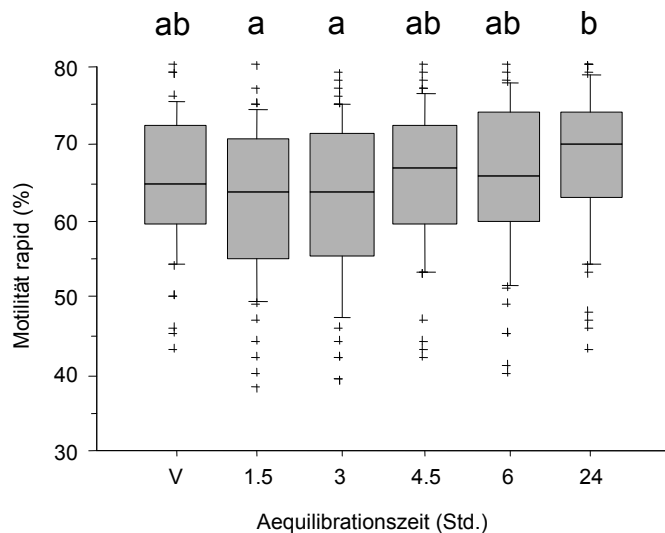
Die Medianwerte der progressiven Motilität nach unterschiedlicher Aequilibrationszeit sind in Form von Boxplots in Abbildung 10 grafisch dargestellt. Die Medianwerte der progressiven Motilität schwankten je nach Aequilibrationszeit zwischen 53.0% und 56.0%. Zwischen den einzelnen Methoden waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar.



**Abbildung 10:** Boxplot der progressiven Motilität nach unterschiedlichen Aequilibrationszeiten: V (Endverdünnung), 1.5 Std., 3 Std., 4.5 Std., 6 Std. und 24 Std.

### Gesteigerte Motilität

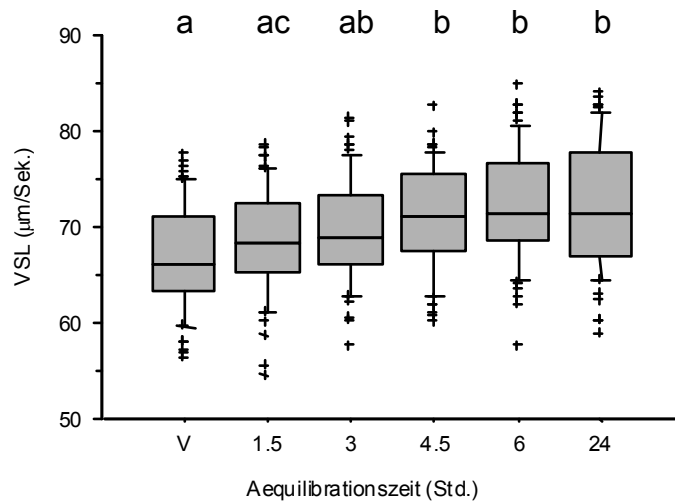
Die Medianwerte der gesteigerten (rapiden) Motilität nach unterschiedlicher Aequilibrationszeit sind in Form von Boxplots in Abbildung 11 grafisch dargestellt. Die Medianwerte der gesteigerten Motilität schwankten je nach Aequilibrationszeit zwischen 63.5% und 70.0%. Zwischen den nach 1.5 und 24 Std. sowie nach 3 und 24 Std. gemessenen Werten waren signifikante Unterschiede vorhanden.



**Abbildung 11:** Boxplot der rapiden Motilität nach unterschiedlichen Aequilibrationszeiten: V (Endverdünnung), 1.5 Std., 3 Std., 4.5 Std., 6 Std. und 24 Std. Boxplots mit unterschiedlichen Indices<sup>ab</sup> sind signifikant ( $P < 0.05$ ) verschieden.

### Spermiengeschwindigkeit

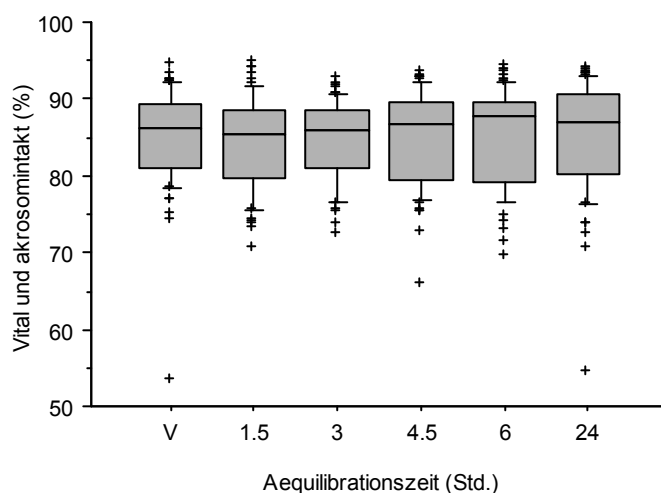
Die Medianwerte der Spermiengeschwindigkeit nach unterschiedlicher Aequilibrationszeit sind in Form von Boxplots in Abbildung 12 grafisch dargestellt. Die Medianwerte der Spermiengeschwindigkeit schwankten je nach Aequilibrationszeit zwischen 66.3  $\mu\text{m/s}$  und 71.5  $\mu\text{m/s}$ . Die nach der Endverdünnung (V) gemessenen Werte waren signifikant geringer als nach 4.5 Std., 6 Std. und 24 Std. Aequilibrationszeit. Die nach 1.5 Std. gemessenen Werte waren signifikant tiefer als die nach 4.5, 6 und 24 Std.



**Abbildung 12:** Boxplot-Darstellung der Spermengeschwindigkeit VSL nach unterschiedlichen Aequilibrationszeiten: V (Endverdünnung), 1.5 Std., 3 Std., 4.5 Std., 6 Std. und 24 Std. Boxplots mit unterschiedlichen Indices<sup>abc</sup> sind signifikant ( $P < 0.05$ ) verschieden.

### Vitale und akrosomintakte Spermien

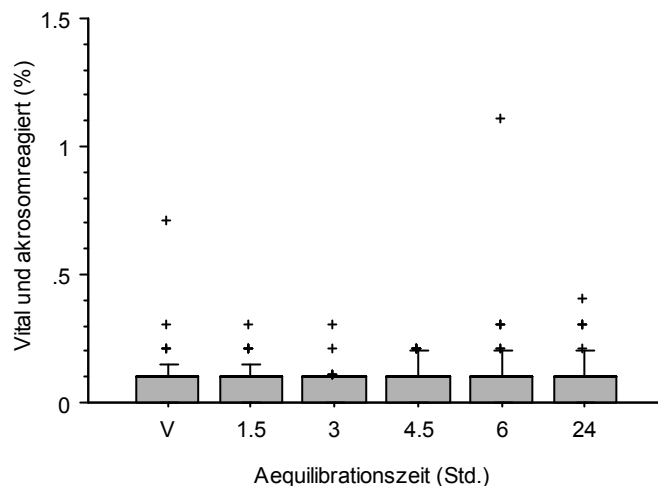
Die Medianwerte von vitalen und akrosomintakten Spermien nach unterschiedlicher Aequilibrationszeit sind in Form von Boxplots in Abbildung 13 grafisch dargestellt. Die Medianwerte schwankten je nach Aequilibrationszeit zwischen 85.5% und 87.7%. Zwischen den einzelnen Methoden waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar.



**Abbildung 13:** Boxplot-Darstellung der Medianwerte der vitalen und akrosomintakten Spermien nach unterschiedlichen Aequilibrationszeiten: V (Endverdünnung), 1.5 Std., 3 Std., 4.5 Std., 6 Std. und 24 Std.

### Vitale und akrosomreagierte Spermien

Die Medianwerte der vitalen und akrosomreagierten Spermien nach unterschiedlicher Aequilibrationszeit sind in Form von Boxplots in Abbildung 14 grafisch dargestellt. Die Medianwerte der vitalen und akrosomreagierten Spermien betrugen bei allen Aequilibrationszeiten 0.1% und zwischen den einzelnen Methoden waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar.



**Abbildung 14:** Boxplot-Darstellung der vitalen und akrosomreagierten Spermien nach unterschiedlichen Aequilibrationszeiten: V (Endverdünnung), 1.5 Std., 3 Std., 4.5 Std., 6 Std. und 24 Std.

### 5.2.2 Samenqualität nach dem Auftauen

Die Ergebnisse zur Überprüfung des Einflusses von Stier, Aequilibrationszeit und der Interaktion von Stier und Aequilibrationszeit auf die Qualität des aufgetauten Gefriersamens sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Daraus ist ersichtlich, dass der Stier einen signifikanten Einfluss auf alle Parameter ausser dem Prozentsatz an vitalen und akrosomreagierten Spermien 10 Min. nach dem Auftauen hatte. Sämtliche Parameter im aufgetauten Samen wurden signifikant von der Dauer der Aequilibrationszeit beeinflusst. Die Interaktion von Stier und Aequilibrationszeit hatte keinen signifikanten Einfluss auf die gemessenen Parameter.



**Tabelle 4:** Einfluss von Stier, Aequilibrationszeit und Interaktion von Stier und Aequilibrationszeit auf die Samenqualität 10 und 120 Min. nach dem Auftauen.

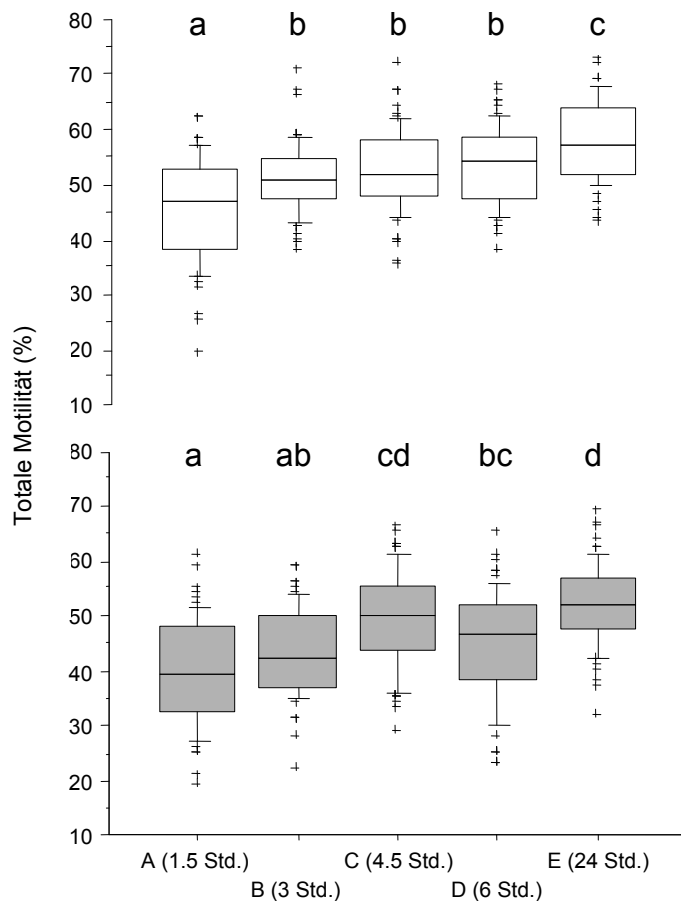
Parameter	Stier <i>P</i>	Aequilibrationszeit <i>P</i>	Stier/Methode <i>P</i>
Motilität total 10‘	<.0001*	<.0001*	.6838
Motilität total 120‘	<.0001*	<.0001*	.9769
Motilität progressiv 10‘	<.0001*	<.0001*	.8885
Motilität progressiv 120‘	<.0001*	<.0001*	.9148
Motilität rapid 10‘	<.0001*	<.0001*	.6927
Motilität rapid 120‘	<.0001*	<.0001*	.9758
Geschwindigkeit 10‘	<.0001*	<.0001*	.5174
Geschwindigkeit 120‘	<.0001*	<.0001*	.9978
Vital und akrosomintakt 10‘	<.0001*	<.0001*	.8397
Vital und akrosomintakt 120‘	<.0001*	<.0001*	.1967
Vital und akrosomreagiert 10‘	.8995	<.0001*	.9996
Vital und akrosomreagiert 120‘	<.0001*	<.0001*	.1017
DNA-Integrität 10‘	<.0001*	<.0001*	.4839

\*signifikant ( $P < 0.05$ )

### **Totale Motilität**

Die Medianwerte der totalen Motilität nach unterschiedlichen Aequilibrationszeiten (A-E), 10 und 120 Min. nach dem Auftauen, sind in Form von Boxplots in Abbildung 15 grafisch dargestellt. Die Medianwerte der totalen Motilität schwankten je nach Aequilibrationszeit zwischen 47.0% (A) und 57.5% (E), bzw. 39.5% (A) und 52.0% (E), 10 und 120 Min. nach dem Auftauen. Signifikante geringere bzw. höhere Motilitäten waren bei 10-minütiger Inkubation zwischen den Methode A und E sowie allen übrigen Methoden vorhanden. Auch nach 120-minütiger Inkubation nach dem Auftauen waren die Motilitäten bei der Methode A am geringsten mit signifikanten Unterschieden im Vergleich zu den Methoden C, D und E. Signifikante Unterschiede

wurden auch zwischen den Methoden B und C bzw. E und zwischen den Methoden D und E festgestellt.

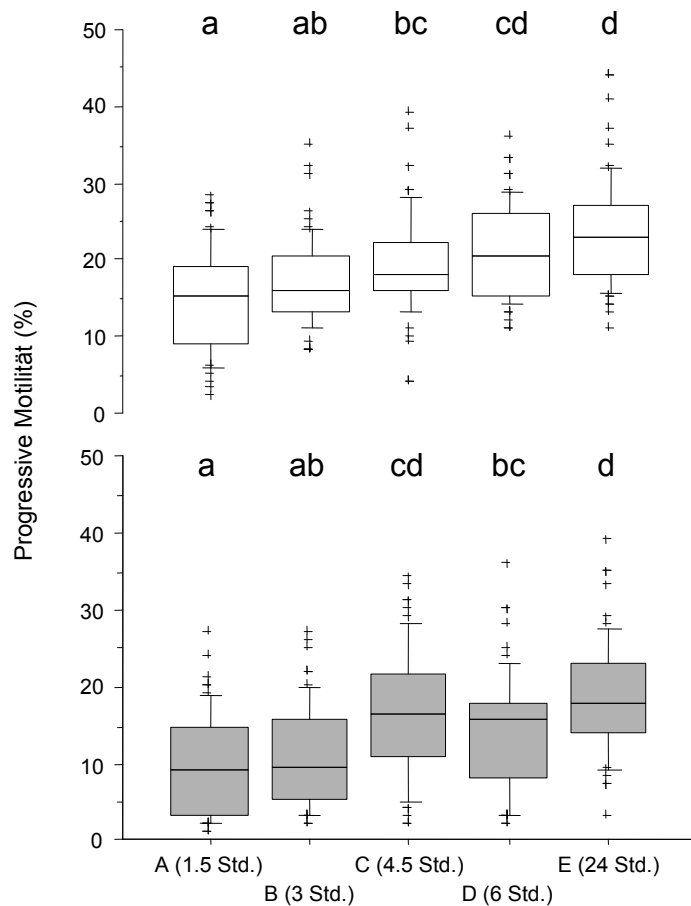


**Abbildung 15:** Boxplot der totalen Motilität 10 Min. (□) und 120 Min. (■) nach dem Auftauen von Gefriersamen bei vorgängig unterschiedlichen Aequilibrationszeiten, A (1.5 Std.), B (3 Std.), C (4.5 Std.), D (6 Std.) und E (24 Std.). Boxplots mit unterschiedlichen Indices<sup>abcd</sup> sind signifikant ( $P < 0.05$ ) verschieden.

### Progressive Motilität

Die Medianwerte der progressiven Motilität nach unterschiedlichen Aequilibrationsszeiten (A-E), 10 und 120 Min. nach dem Auftauen, sind in Form von Boxplots in Abbildung 16 grafisch dargestellt. Die Medianwerte der progressiven Motilität schwankten je nach Aequilibrationszeit zwischen 15.0% (A) und 23.0% (E) bzw. 9.0% (A) und 18.0% (E), 10 und 120 Min nach dem Auftauen. Signifikante Unterschiede waren bei 10-minütiger Inkubation zwischen Methode A und den Methoden C, D und E sowie zwischen Methode B und den Methoden D und E und ebenso zwischen den Methoden C und E vorhanden. Bei 120-minütiger Inkubation waren zwischen Methode A und den Methoden C, D und E sowie zwischen Methode

B und den Methoden C und E und auch zwischen den Methoden D und E signifikante Unterschiede vorhanden.

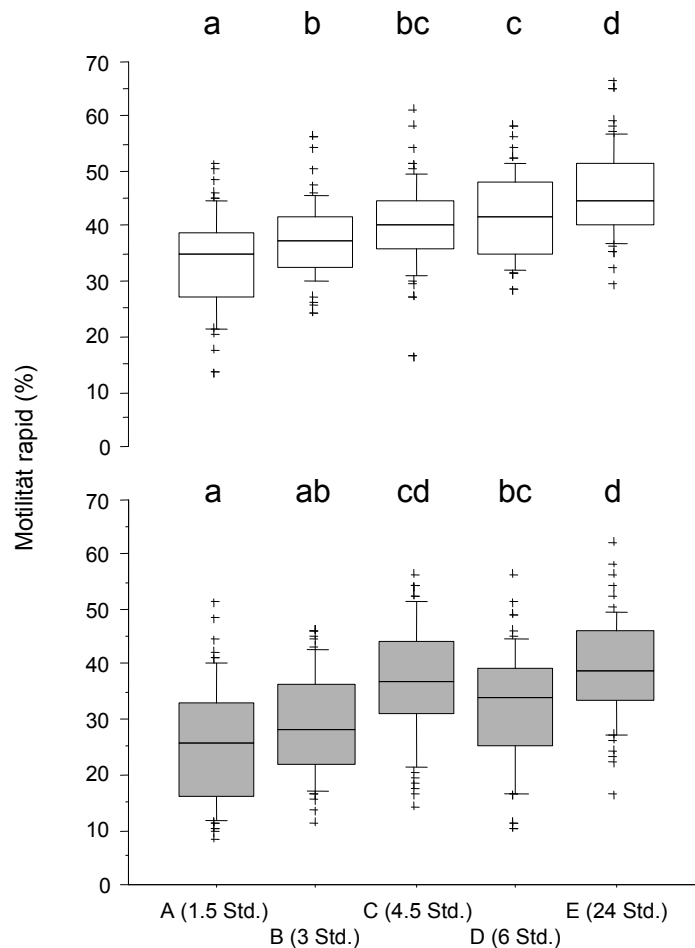


**Abbildung 16:** Boxplot der progressiven Motilität 10 Min. (□) und 120 Min. (■) nach dem Auftauen von Gefriersamen bei vorgängig unterschiedlichen Aequilibrationszeiten, A (1.5 Std.), B (3 Std.), C (4.5 Std.), D (6 Std.) und E (24 Std.). Boxplots mit unterschiedlichen Indices<sup>abcd</sup> sind signifikant ( $P < 0.05$ ) verschieden.

### Gesteigerte Motilität

Die Medianwerte der gesteigerten Motilität nach unterschiedlichen Aequilibrationsszeiten (A-E), 10 und 120 Min. nach dem Auftauen, sind in Form von Boxplots in Abbildung 17 grafisch dargestellt. Die Medianwerte der rapiden Motilität schwankten je nach Aequilibrationszeit zwischen 35.0% (A) und 45.0% (E) bzw. zwischen 26.0% (A) und 39.0% (E), 10 und 120 Min. nach dem Auftauen. Signifikante Unterschiede waren bei 10-minütiger Inkubation zwischen Methode A und allen anderen Methoden, zwischen Methode B und den Methoden D und E, sowie zwischen der Methode E und den Methoden C und D vorhanden. Bei 120-

minütiger Inkubation waren zwischen Methode A und den Methoden C, D und E, zwischen Methode B und den Methoden C und E, sowie zwischen den Methoden D und E signifikante Unterschiede vorhanden.

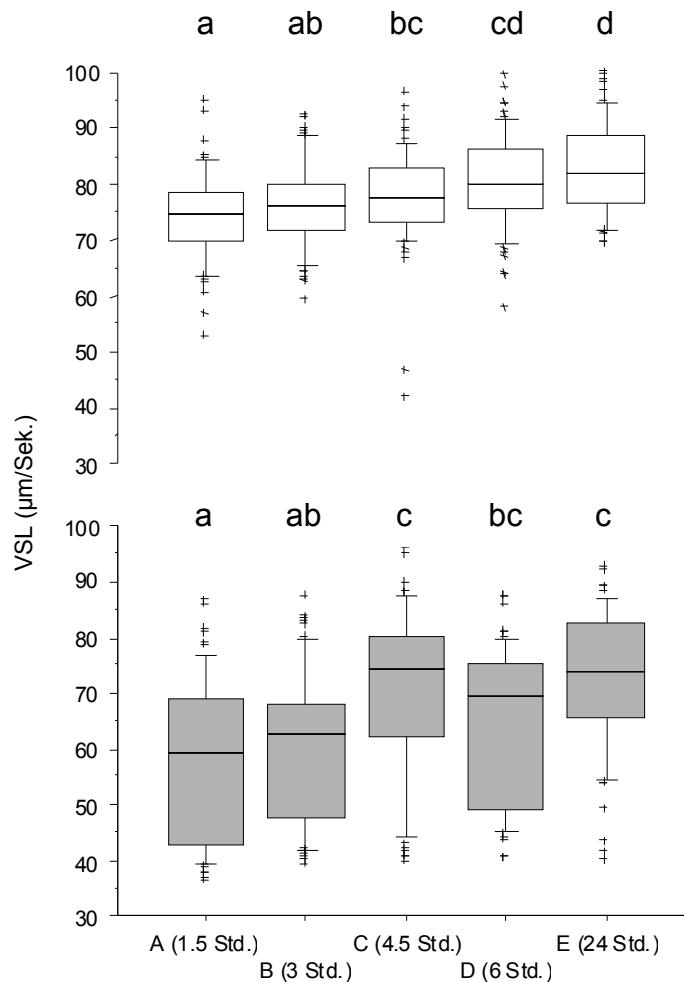


**Abbildung 17:** Boxplot der rapiden Motilität 10 Min. (□) und 120 Min. (■) nach dem Auftauen von Gefriersamen bei vorgängig unterschiedlichen Aequilibrationszeiten, A (1.5 Std.), B (3 Std.), C (4.5 Std.), D (6 Std.) und E (24 Std.). Boxplots mit unterschiedlichen Indices<sup>abcd</sup> sind signifikant ( $P < 0.05$ ) verschieden.

### Spermiengeschwindigkeit

Die Medianwerte der Spermiengeschwindigkeit nach unterschiedlichen Aequilibrationszeiten (A-E), 10 und 120 Min. nach dem Auftauen, sind in Form von Boxplots in Abbildung 18 grafisch dargestellt. Die Medianwerte der Spermiengeschwindigkeit schwankten je nach Aequilibrationszeit zwischen 74.7  $\mu\text{m/s}$  (A) und 82.0  $\mu\text{m/s}$  (E) bzw. zwischen 59.2  $\mu\text{m/s}$  (A) und 74.2  $\mu\text{m/s}$  (C), 10 und 120 Min. nach dem Auftauen. Signifikante Unterschiede waren bei 10-minütiger Inkubation zwischen Methode A und den Methoden C, D und E, zwischen Methode B

und den Methoden D und E, sowie zwischen den Methoden C und E vorhanden. Bei 120-minütiger Inkubation waren zwischen Methode A und den Methoden C, D und E sowie zwischen den Methoden B, C und E signifikante Unterschiede vorhanden.

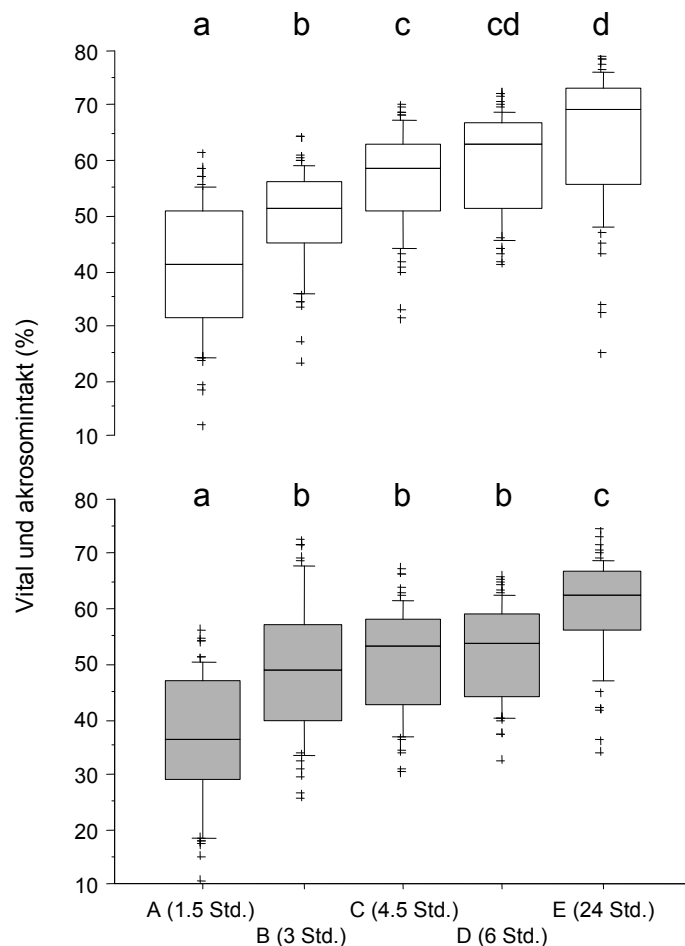


**Abbildung 18:** Boxplot der Spermengeschwindigkeit nach unterschiedlichen Aequilibrationszeiten 10 Min. (□) und 120 Min. (■) nach dem Auftauen von Gefriersamen bei vorgängig unterschiedlichen Aequilibrationszeiten, A (1.5 Std.), B (3 Std.), C (4.5 Std.), D (6 Std.) und E (24 Std.). Boxplots mit unterschiedlichen Indices<sup>abcd</sup> sind signifikant ( $P < 0.05$ ) verschieden.

### Vitale und akrosomintakte Spermien

Die Medianwerte der vitalen und akrosomintakten Spermien nach unterschiedlichen Aequilibrationszeiten, 10 und 120 Min. nach dem Auftauen, sind in Form von Boxplots in Abbildung 19 grafisch dargestellt. Die Medianwerte schwankten je nach Aequilibrationszeit zwischen 41.1% (A) und 69.3% (E) bzw. 36.4% (A) und 62.6% (E), 10 und 120 Min. nach dem Auftauen. Signifikante Unterschiede waren bei 10-minütiger Inkubation zwischen sämtlichen Methoden, ausgenommen zwischen den Methoden C und D sowie D und E vorhanden. Bei 120-minütiger Inkubation waren

zwischen Methode A sowie Methode E und sämtlichen anderen Methoden signifikante Unterschiede vorhanden. Zwischen den Methoden B, C und D waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

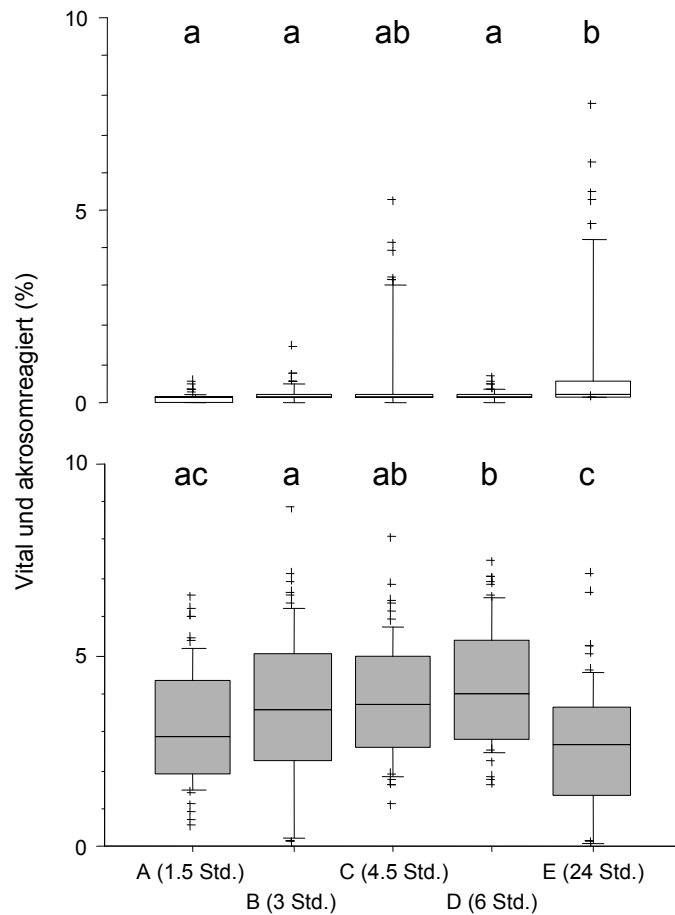


**Abbildung 19:** Boxplot der vitalen und akrosomintakten Spermien 10 (□) und 120 Min. (■) nach dem Auftauen von Gefriersamen bei vorgängig unterschiedlichen Aequilibrationszeiten, A (1.5 Std.), B (3 Std.), C (4.5 Std.), D (6 Std.) und E (24 Std.). Boxplots mit unterschiedlichen Indices<sup>abcd</sup> sind signifikant ( $P < 0.05$ ) verschieden.

### Vitale und akrosomreagierte Spermien

Die Medianwerte der vitalen und akrosomreagierten Spermien nach unterschiedlichen Aequilibrationszeiten, 10 und 120 Min. nach dem Auftauen, sind in Form von Boxplots in Abbildung 20 grafisch dargestellt. Die Medianwerte schwankten je nach Aequilibrationszeit zwischen 0.1% (A, B, C, D) und 0.2% (E) bzw. 2.9% (A) und 4.0% (D), 10 und 120 Min. nach dem Auftauen. Signifikante Unterschiede waren bei 10-minütiger Inkubation zwischen den Methoden A, B, D und E vorhanden. Bei 120-minütiger Inkubation waren zwischen Methode E und

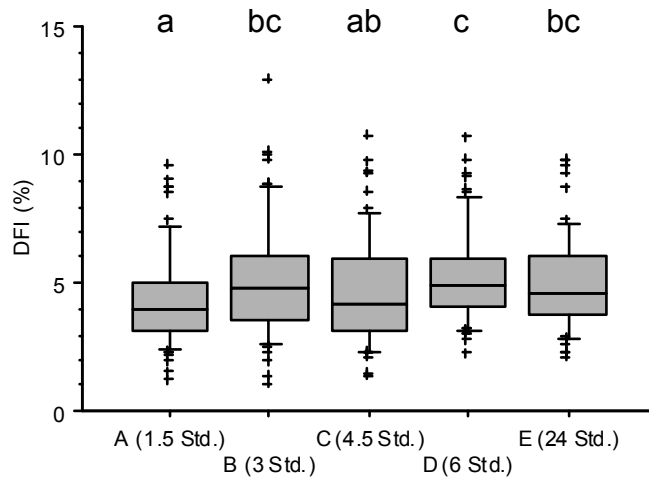
sämtlichen anderen Methoden sowie zwischen den Methoden D und A bzw. B, signifikante Unterschiede vorhanden.



**Abbildung 20:** Boxplot der vitalen und akrosomreagierten Spermien 10 (□) und 120 Min. (■) nach dem Auftauen von Gefriersamen bei vorgängig unterschiedlichen Aequilibrationszeiten, A (1.5 Std.), B (3 Std.), C (4.5 Std.), D (6 Std.) und E (24 Std.). Boxplots mit unterschiedlichen Indices<sup>abc</sup> sind signifikant ( $P < 0.05$ ) verschieden.

### DNA-Integrität

Die Medianwerte der DNA-Fragmentationsindexe (DFI %) nach unterschiedlichen Aequilibrationszeiten, 10 Min. nach dem Auftauen, sind in Form von Boxplots in Abbildung 21 grafisch dargestellt. Die Medianwerte der DFI-Werte schwankten je nach Aequilibrationszeit zwischen 4.0% (A) und 4.9% (D). Signifikante Unterschiede waren zwischen Methode A und den Methoden B, D und E sowie zwischen den Methoden C und D vorhanden.



**Abbildung 21:** Boxplot der DNA-Fragmentationsindexe (■) nach dem Auftauen von Gefriersamen bei vorgängig unterschiedlichen Aequilibrationszeiten, A (1.5 Std.), B (3 Std.), C (4.5 Std.), D (6 Std.) und E (24 Std.). Boxplots mit unterschiedlichen Indices<sup>abc</sup> sind signifikant ( $P < 0.05$ ) verschieden.



## 6 Diskussion

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen aus dem Versuch I zeigen, dass im Vergleich zur Standardmethode (V0) die kontinuierlich fraktionierte (V1) sowie die direkte und schnelle (V2) Verdünnerzugabe zum Erreichen der Endverdünnung keinen signifikanten Einfluss auf die Spermienqualitätsparameter ausübten. Nach der Vorverdünnung des Ejakulates im Verhältnis von 1:2 und einer anschliessenden Inkubationszeit von 5 Min. bei Wasserbadtemperatur von 32°C scheint es nicht mehr entscheidend zu sein, ob die Endverdünnung (80 Mio Spermien/ml) kontinuierlich fraktioniert oder durch schnelle einmalige Verdünnerzugabe erreicht wird. Als mögliche Erklärung für diese Beobachtung muss in erster Linie die optimale Zusammensetzung des Verdünners in Betracht gezogen werden. Das in unseren Versuchen verwendete Verdünnermedium Triladyl® (Minitüb, Deutschland), bestehend aus TRIS-Eigelb, Zitronensäure, Zucker, Puffer, Glycerin, Reinstwasser und Antibiotika (Spectinomycin, Lincomycin, Tylosin, Gentamycin), erwies sich in seinen kryoprotektiven und membranstabilisierenden Eigenschaften als äusserst zuverlässig. Eine entscheidende Rolle kommt auch der Art und Weise zu, wie verdünnt wird. Um Samenzellschädigungen beim Verdünnen (Verdünnungsschock) des Ejakulates zu vermeiden, muss das auf 32°C vorgewärmte Verdünnermedium langsam zum Ejakulat dazugegeben werden. Bei einer raschen Verdünnerzugabe zum Ejakulat wird neben den Spermien auch das Seminalplasma mit seinen wichtigen Substanzen zur Aufrechterhaltung der Membranintegrität und Funktionalität der Samenzelle rasch verdünnt, was zu Schädigungen am Spermium führen kann (Maxwell und Johnson, 1999; Garner et al., 2001). Untersuchungen über den Einfluss der Geschwindigkeit der Verdünnerzugabe zur Kryokonservierung von Stiersamen auf die Qualität von Gefriersamen sind bisher in der Literatur nicht publiziert. Unsere Ergebnisse sind deshalb von grosser Bedeutung bei der Samenverarbeitung in den Besamungsstationen. Eine rasche Verdünnung der Ejakulate führt zu einer Zeitersparnis, die sich auch in den folgenden Arbeitsschritten bei optimaler Samenqualität günstig auswirkt. Die Auswertung der Ergebnisse zur Samenqualität aus dem Versuch II zeigt, dass unterschiedlich lange Aequilibrationszeiten auf die Samenqualität vor dem Tiefgefrieren keinen signifikanten Einfluss hatten. Die Auswirkungen der Aequilibrationsdauer zeigen sich hingegen sehr deutlich anhand der Qualität des aufgetauten Samens. Kurze

Aequilibrationszeiten von 1.5 und 3 Std. bewirken im Vergleich zu langen Aequilibrationszeiten von 6 und 24 Std. eine signifikant schlechtere Samenqualität nach dem Auftauen. Diese Beobachtung kann damit erklärt werden, dass die Adaptation der Spermienmembranen an tiefe Temperaturen während der Aequilibrationszeit zeitabhängig ist, wobei in unserem Versuch das Eigelb im Verdünner eine wichtige Rolle spielt. Eigelb enthält Low Density Lipoproteine (LDL) die an die Spermienmembranen binden und diese stabilisieren, so dass während dem Einfrier- und Auftauprozess der Verlust von Membranphospholipiden gehemmt wird. (Parks und Graham, 1992). Verantwortlich für den Verlust von Phospholipiden sowie Cholesterin aus der Spermienmembran ist das bovine Serum Albumin (BSA), welches aus der Samenblase stammt und die Spermienmembran destabilisiert (Majunath et al., 1993). Dieser Effekt ist Zeit- sowie Konzentrationsabhängig und kann durch die LDL aus dem Eigelb gehemmt werden (Majunath et al., 2002).

Bei Verdünnern, in denen das Eigelb durch Soja-Lezithin ersetzt wurde, wie AndroMed® (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) oder Biociphos Plus® (Aîgle, Frankreich), führen lange Aequilibrationszeiten zu einer deutlich schlechteren Qualität des aufgetauten Gefriersamens als bei eigelbhaltigen Verdünnern (Amirat et al., 2005; Muiño et al., 2007). Ähnlich wie bei eigelbhaltigen Verdünnern wirken sich lange Aequilibrationszeiten auch bei Milchverdünnern positiv auf die Qualität des Gefriersamens aus. So konnten Foote und Kaproth (2002) zeigen, dass die Motilität im aufgetauten Samen bei einer Aequilibrationszeit von 18 Std. signifikant besser war als bei 4 Std. Die NRR56 nach 14'775 Erstbesamungen mit Gefriersamen der 28 oder 4 Std. aequilibriert wurde, war jedoch nicht signifikant verschieden (Foote und Kaproth, 2002).

In unseren Untersuchungen zeigte sich zudem, dass keine signifikante Interaktion zwischen Stier und der jeweilig untersuchten Verarbeitungsmethode vorhanden war und deshalb keine Rückschlüsse auf eine individuell und optimal abgestimmte Verarbeitungsmethode zulässig sind. Unsere Ergebnisse liefern keinen Hinweis auf die in der Literatur zitierten „good freezer“ und „bad freezer“ (Watson, 1995; Curry, 2000; Watson, 2000), wonach sich Samen bestimmter Stiere unter identischen Einfrierbedingungen besser oder schlechter einfrieren lässt. Dies dürfte darauf beruhen, dass in unserer Studie nur Stiere mit guter Samenqualität berücksichtigt wurden, die in der Produktion standen und alle Anforderungen in Bezug auf die Samenqualität erfüllten. Inwieweit Samen von minderer Qualität durch Änderungen

von Verdünnungsgeschwindigkeit und unterschiedlichen Aequilibrationszeiten positiv beeinflusst werden kann, muss in weiteren Experimenten abgeklärt werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass in der Routineproduktion Abweichungen in der Verdünnungsgeschwindigkeit bei Verwendung von Triladyl® als Verdünner die Qualität von Gefriersamen nicht beeinflussen. Da verlängerte Aequilibrationszeiten von 6 oder auch 24 Std. die Samenqualität nach dem Auftauen gegenüber der Standardmethode von 4.5 Std. verbesserten, kann diesbezüglich eine Optimierung im Kryokonservierungsprozess erreicht werden.



## 7 Literatur

Amirat L, Anton M, Tainturier D, Chatagnon G, Battut I, Courtens JL. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction* 2005; 129: 535-543.

Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 2000; 21:1-7.

Cheng FP, Fazelli A, Voorhout WF, Marks A, Bevers MM, Collenbrander B. Use of PNA to assess the acrosomal status and zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J Androl* 1996; 17: 674-682.

Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod* 2000; 5: 46-52.

DeJarnette MS. Factors affecting the quality of frozen semen after thawing. *Proc 32<sup>th</sup> Ann Meet Soc for Theriogenology*, Nashville, Tennessee, 1999: 267-279.

Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod Toxicol* 1991; 5: 115-125.

Evenson DP, Thomson L, Jost L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 1994; 41: 637-651.

Evenson DP, Sailer BL, Jost LK. Relationship between stallion sperm deoxyribonucleic acid (DNA) susceptibility to denaturation in situ and presence of DNA strand breaks: implications for fertility and embryo viability. *Biol Reprod Mono* 1995; 1: 655-659.

Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002; 23: 25-43.

Foote RH, Kaproth MT. Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. *J Dairy Sci* 2002; 85: 453-456.

Garner DL, Thomas CA, Gravance CG. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 1999; 34: 399-404.

Garner DL, Thomas CA, Gravance CG, Marshall CE, DeJarnette JM, Allen CH. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology* 2001; 56: 31-40.

Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 3-22.

Krienke M. Evaluierung durchflusszytometrischer Verfahren zur Beurteilung der Qualität von kryokonserviertem Hengstsperma. Dissertation, Universität München, 2003.

Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey JL, Sullivan R. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *J Androl* 2000; 5: 700-707.

Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod*; 1993: 49, 27-37.

Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod* 2002; 67: 1250–1258.

Maxwell WMC, Johnson LA. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 1999; 52: 1353-1362.

Muino R, Fernandez M, Pena AI. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reprod Dom Anim* 2007; 42: 305-311.

Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 1992; 38, 209-222.

Salomon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci* 2000; 38: 77-111.

Tardif AL, Farrell PB, Trouern-Trend V, Simkin ME, Foote RH. Use of Hoechst 33342 stain to evaluate live fresh and frozen bull sperm by computer-assisted analysis. *J Androl*; 19: 201-206.

Thun R, Hurtado M, Janett F. Comparison of Biociphos-Plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology* 2002; 57: 1087-1094.

Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 23-53.

Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the Assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 871-891.

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*. 2000; 60-61: 481-492.





## 8 Dank

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir beim Erstellen dieser Arbeit geholfen haben.

Herrn Dr. J. Kneubühler, Stationsleiter Swissgenetics, für die Betreuung und Hilfestellung in der Versuchsphase sowie Herrn Dr. U. Witschi, Leiter der Produktion für die finanzielle Unterstützung durch Swissgenetics.

Herrn Prof. Dr. R. Thun, Klinik für Fortpflanzungsmedizin der Universität Zürich, für die Überlassung des Themas und die Hilfestellung beim Niederschreiben der Arbeit.

Frau PD Dr. G. Hirsbrunner, Klinik für Wiederkäuer der Universität Bern, für die Übernahme des Korreferates.

Herrn PD Dr. F. Janett, Klinik für Fortpflanzungsmedizin der Universität Zürich, für die grosse Unterstützung sowie die fachliche Leitung und Betreuung während der ganzen Versuchsphase.

Allen Labor- und Stallmitarbeitern von Swissgenetics für die Unterstützung der Versuchsarbeiten.

Herrn A. Urwyler, Cytolab, für die flowzytometrischen Analysen.

Meiner Familie für die stetige Unterstützung.



## Lebenslauf

Rebecca Rickenbacher

Geboren am 31. Dezember 1982

Heimatort: Läfelfingen BL

1989–1994            Primarschule Läfelfingen

1994–1998            Sekundarschule Progymnasium Sissach

1998–2001            Gymnasium Liestal

2002–2007            Studium der Veterinärmedizin, Universität Bern

2007–2009            Doktorandin an der Klinik für Fortpflanzungsmedizin der  
Universität Zürich

Läfelfingen, 18.7.2009

Rebecca Rickenbacher